# 酿酒酵母蔗糖转化酶 Suc2 分泌途径的改造

王雪妍，付　彤，陆雨婷，申瑞雨，李宪臻，杨　帆*

（大连工业大学 生物工程学院，辽宁 大连　116034）

**摘　要**　为提高酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）在菊糖发酵中的乙醇生产效率，考察了优化分泌途径和二倍体菌株构建相结合的策略对蔗糖转化酶 Suc2 分泌效率和乙醇产量的影响。以 BY4741 和 BY4742 为出发菌株，利用 *PGK1p* 启动子实现囊泡运输关键蛋白 Sec1 和 Sso2 过表达，构建重组菌株 BYCO 与 BY2CO，并通过二倍体配合获得 BY3CO。将携带 MFα 信号肽的 Suc2 表达载体转化至工程菌，评估菌株 *SEC1*、*SSO2* 的转录水平、胞外蛋白分泌量及 Suc2 的分泌效率。结果显示，重组菌株 *SEC1* 和 *SSO2* 的转录水平显著上调，二倍体菌株 BY3COmS 的胞外蛋白分泌量较原始菌株 BYmS 提高 216.67%，Suc2 分泌效率提升 86.46%。连续发酵性能分析结果表明，BY3COmS 在 84 h 时生物量达 35.00 g/L，乙醇产量 100.38 g/L，较 BYmS 分别提高 33.49% 和 12.61%，同时菊糖转化率提升 10.32%，达到 94.77%。本研究结果表明，通过强化囊泡运输通路与构建二倍体菌株的协同作用，可以显著提高 Suc2 的分泌效率，提升酿酒酵母的乙醇生产性能，为构建高效菊糖转化酿酒酵母工程菌提供了新的技术路径。

**关键词**　酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）；蔗糖转化酶 Suc2；分泌途径；二倍体；生物乙醇；菊糖

**中图分类号**　Q939.97　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1005－7021(2026)03－0019－09

doi：10.3969/j.issn.1005－7021.2026.03.002

# Modification of the Secretion Pathway of Sucrose Invertase Suc2 in *Saccharomyces cerevisiae*

WANG Xue-yan, FU Tong, LU Yu-ting, SHEN Rui-yu, LI Xian-zhen, YANG Fan*

(*Schl. of Bio-Engin., Dalian Polytech. Uni., Dalian* 116034)

**Abstract**　To enhance the ethanol production efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* in inulin fermentation, this study investigated the combined strategy of optimizing the secretion pathway and constructing diploid strains to improve the secretion efficiency of sucrose invertase (Suc2) and ethanol yield. Starting with the BY4741 and BY4742 strains, a *PGK1p* promoter replacement strategy was applied to construct recombinant strains BYCO and BY2CO, which overexpress the vesicle transport-related genes *SEC1* and *SSO2*. Diploid strain BY3CO was obtained through diploid mating. Following the transformation of the engineered strains with an MFα signal peptide-tagged Suc2 expression vector, the transcription levels of *SEC1* and *SSO2*, extracellular protein secretion, and Suc2 secretion efficiency were assessed. The results showed significant upregulation of *SEC1* and *SSO2* transcription in the recombinant strains. The extracellular protein secretion of the diploid strain BY3COmS increased by 216.67% compared to the original strain BYmS, and Suc2 secretion efficiency improved by 86.46%. Continuous fermentation analysis revealed that after 84 h, BY3COmS achieved a biomass of 35.00 g/L and ethanol production of 100.38 g/L, representing increases of 33.49% and 12.61%, respectively, compared to BYmS. Additionally, the inulin conversion rate improved by 10.32%, reaching 94.77%. This study demonstrates that the synergistic enhancement of vesicle transport pathways and the construction of diploid strains significantly improve Suc2 secretion efficiency and ethanol production performance in *S. cerevisiae*.

基金项目：国家自然科学基金面上项目（32072160）；辽宁省重点攻关项目（JYTZD2023029）

作者简介：王雪妍　女，博士研究生。主要研究方向为酶工程、发酵工程。E-mail：xueyan_wang@xy.dlpu.edu.cn

* 通讯作者。女，教授，博士，博士生导师。主要研究方向为酶工程与糖工程。E-mail：yang_fan@dlpu.edu.cn

收稿日期：2025-06-06

These findings provide a novel technical approach for the development of efficient inulin-converting *S. cerevisiae* strains for bioethanol production.

**Keywords** *Saccharomyces cerevisiae*; sucrose invertase Suc2; secretion pathway; diploid; bioethanol; inulin

在可再生清洁能源需求不断增长的驱动下，生物乙醇作为可再生清洁能源已确立其替代化石燃料的战略地位。当前生物乙醇产业正加速从粮食基糖类(葡萄糖、淀粉等)发酵[1]向菊糖等非粮生物质原料转型[2-3]，旨在缓解“与粮争地”矛盾并推动该产业可持续发展。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)因遗传背景清晰、乙醇耐受性强及增殖速度快等特性，成为生物乙醇工业生产的优选宿主[4-6]。该菌株分泌的胞外蔗糖水解酶 Suc2 是其降解菊糖的关键功能蛋白[7]，其表达水平直接决定菊糖代谢效率及乙醇产量[8]。因此，优化 Suc2 的分泌表达途径有望提高酿酒酵母发酵菊糖生产生物乙醇的能力，对提升菊糖基生物乙醇的发酵能力有指导性意义。目前提升 Suc2 表达分泌水平的研究主要集中在启动子工程[9-11]、信号肽优化[12-14]与分子伴侣模块等方面[15]。具体而言，在启动子工程方向，Wang 等[10]通过引入 Msn2/Msn4 转录因子结合位点优化 Suc2 基因启动子序列，显著提升了该基因的转录与翻译效率；在信号肽优化方向，MFα 信号肽的引入可定向增强 Suc2 的分泌水平[14]；Hou 等[15]通过过表达分子伴侣调控因子 Hsf1，实现了 Suc2 产量的大幅提升。尽管上述策略取得了一定进展，但相关研究还不够深入，且对 Suc2 的分泌水平提升效果有限，使得乙醇合成效能提升不显著。酿酒酵母蛋白质分泌效率的提升主要依赖于分泌途径工程的系统优化[16-18]。分泌途径工程研究聚焦于内质网-高尔基体-质膜的完整转运链[19]，相较于内质网-高尔基体阶段，高尔基-质膜阶段的囊泡运输途径组分的过表达，对蛋白质分泌的增益效果更为显著[20]。研究表明，过表达高尔基体向细胞膜运输的囊泡蛋白 Sec1 等可使 β-葡萄糖苷酶胞外活性提高 2.1 倍[21]，胞吐过程相关的质膜受体蛋白 Sso2 的高效表达也能够显著提升蛋白分泌水平[22]。由此推测，靶向后期囊泡运输通路的协同调控可能是突破酿酒酵母分泌 Suc2 瓶颈的关键策略，为构建高效细胞工厂提供了理论依据与技术路径。除酶分泌水平限制外，工业发酵环境中的多重胁迫(温度波动[23]、渗透压变化[24]及弱酸/酚类抑制剂[25])可引发酿酒酵母活性衰减与代谢通量失衡[26]，导致菊糖转化效率与乙醇合成效能同步下降。针对这一问题，提升菌株染色体倍性被证实可增强环境适应性与产物合成能力[27]。研究表明，多倍体酵母的乙醇发酵性能显著优于单倍体。Dilorio 等[28]发现四倍体菌株在 50 g/L 葡萄糖体系中单位细胞乙醇产率提升 40%；Liu 等[29]进一步证实，三倍体菌株利用未脱毒玉米芯水解液时，乙醇产量较单倍体提高 28%，揭示了倍性增加可强化底物耐受性。因此，本研究通过强化酿酒酵母 Suc2 的分泌途径并结合倍性工程，以及过表达囊泡运输关键基因 *SEC1* 和 *SSO2*(图 1)，并对重组菌株进行二倍体配合，为提升蔗糖转化酶 Suc2 的分泌效率和乙醇产量，构建高鲁棒性的工业生物乙醇发酵菌株提供参考。

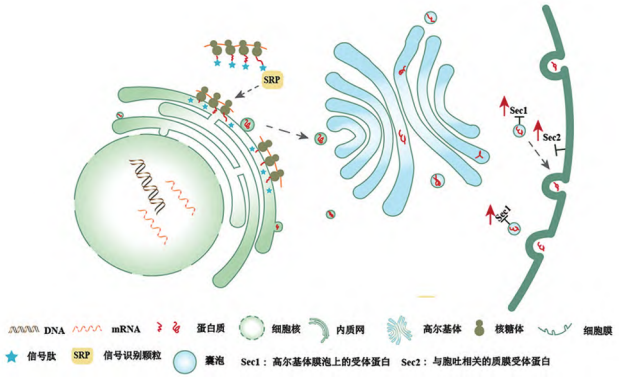



**图 1 酿酒酵母 Suc2 分泌途径工程化改造示意图**

Fig. 1 Schematic diagram of engineering strategies for Suc2 secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741、*Saccharomyces cerevisiae* BY4742、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) DH10B 获赠于中国科学院大连化学物理研究所赵宗保研究员课题组。质粒 pPICZαA、pRS423、pACT2 由杨帆教授课题组(本实验室)保藏。pYC230-*mSUC2* 由本实验室前期构建[14]。其余构建的重组菌株及菌株信息见表 1。

**表 1 本研究所用菌株及菌株信息**

Table 1 Strains used in this study and their information

| 实验菌株 | 备注 |
|---|---|
| BY4741 | 未进行改造的 a 型酿酒酵母 BY4741 |
| BY4742 | 未进行改造的 α 型酿酒酵母 BY4742 |
| BY4743 | 由 BY4741 与 BY4742 配合的二倍体 |
| BYC | 完成了 *SEC1p* 替换的 BY4741 |
| BYCO | 完成了 *SEC1p* 与 *SSO2p* 替换的 BY4741 |
| BY2C | 完成了 *SEC1p* 替换的 BY4742 |
| BY2CO | 完成了 *SEC1p* 与 *SSO2p* 替换的 BY4742 |
| BY3CO | 由 BYCO 和 BY2CO 配合的二倍体 |
| BYmS | 转入了 pYC230-mSUC2 的 BY4741 |
| BYCOmS | 转入了 pYC230-mSUC2 的 BYCO |
| BY2mS | 转入了 pYC230-mSUC2 的 BY4742 |
| BY2COmS | 转入了 pYC230-mSUC2 的 BY2CO |
| BY3mS | 转入了 pYC230-mSUC2 的 BY4743 |
| BY3COmS | 转入了 pYC230-mSUC2 的 BY3CO |

1.1.2 培养基(g/L) LB 培养基:胰蛋白胨 10,酵母浸粉 5,NaCl 10,pH 7.0;YPD 培养基:蛋白胨 20,葡萄糖 20,酵母浸粉 10,pH 6.0;菊糖培养基:菊糖 150,酵母浸粉 5,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 菊糖购自阿拉丁生化科技有限公司;蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司;L-甲硫氨酸、尿嘧啶、L-亮氨酸、L-组氨酸购自北京鼎国生物技术有限公司;氨苄青霉素(Ampicillin,Amp)、G418 硫酸盐、DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、酵母总 RNA 快速抽提试剂盒等购自上海生工生物工程有限公司;rTaq DNA聚合酶、*Sal* I、*Sac* I、*Pst* I 等限制性内切酶、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、PrimeScript 反转录试剂盒、SYBR Ex Taq 试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司;其余试剂均购自天津市科密欧化学试剂有限公司。Mastercycler Pro 梯度 PCR 仪、Multiporator 电转仪均购自 Eppendorf 公司;凝胶成像系统(ImageQuant LAS 4000,通用电器公司);微量分光光度计(Nastercyder pro,通用电器公司);多功能酶标仪(F50,Tecan 公司);紫外分光光度计(UV-5200,上海元析仪器公司);气相色谱(G2630A,安捷伦科技有限公司);离子色谱(ICS-5000,赛默飞世尔科技公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 高效分泌表达 Suc2 的酿酒酵母重组菌株构建 酿酒酵母中 *SEC1* 和 *SSO2* 启动子替换流程见图 2。引物见表 2。分别从基因组中扩增 *SEC1* 和 *SSO2* 启动子区域及其上下游 400 ~ 500 bp 的 DNA 片段,连接至 pMD19-T 载体,命名为 pMD19-T-*SEC1pud* 和 pMD19-T-*SSO2pud*。分别以 pRS423 与 pYC230-*SUC2* 质粒为模板扩增目的片段并重叠延伸得到 *HIS-PGK1p* 片段,利用不依赖限制性内切酶的克隆(Resriction-Freecloning,RF 克隆)技术替换质粒 pMD19-T-*SEC1pud* 中的 *SEC1p* 启动子,得到质粒 pMD19-T-*SEC1pud*::*HPGK1p*,扩增富集 *HIS-PGK1p* 片段,同源重组整合至 BY4741 菌株基因组上得到菌株 BYC。以 pACT2 质粒与 pYC230-*SUC2* 质粒为模板构建 *LEU-PGK1p* 基因片段,替换 pMD19-T-SSO2*pud* 质粒上的 *SSO2p* 启动子,得到质粒 pMD19-T-*SSO2pud*::*LPGK1p*。扩增富集该片段,对菌株 BYC 基因组上的启动子 *SSO2p* 进行替换,得到菌株 BYCO。同理,菌株 BY2C 与 BY2CO 从菌株 BY4742 出发,先将质粒 pMD19-T-*SEC1pud*::*HPGK1p* 中的 *HIS* 筛选标记替换为 *Zeocin* 筛选标记,得到 *Zeocin-PGK1p* 片段,整合至菌株 BY4742 基因组上得到菌株 BY2C,再将 *LEU-PGK1p* 片段整合至 BY2C 基因组得到菌株 BY2CO。将不同交配型单菌落分别接种于 YPD 液体培养基,30 ℃、200 r/min 培养 24 h。取等体积菌液混合培养后,稀释 10 000 倍涂布 YPD 平板,30 ℃培养。通过选择性平板筛选,并进行 PCR 鉴定获得二倍体菌株,经二次验证确认基因型。将携带 MFα 信号肽的 pYC230-*mSUC2* 表达载体电转化至 BYCO、BY2CO、BY3CO 感受态细胞,于 30 ℃生长的 YPD/G418 平板上筛选阳性克隆。挑取单菌落扩大培养后,采用球磨法提取质粒并转化至 *E. coli* DH10B 感受态细胞,于 37 ℃生长的 LB/Amp 平板上筛选阳性克隆。经限制性酶切验证正确的

重组质粒送测序确认，最终获得的菌株信息见表 1。

1.2.2 重组菌株的 *SEC1* 和 *SSO2* 基因表达水平分析 菌株总 RNA 提取方法参考 Wang 等[10]的方法：取在 YPD 液体培养基中培养 24 h 的种子液按 2%（体积分数）接种至菊糖发酵培养基，30 ℃、200 r/min 振荡培养 12 h 后收集菌体，按照酵母总 RNA 快速抽提试剂盒说明书进行 RNA 提取。获取 RNA 后，依次按照 PrimeScript 反转录试剂盒和 SYBR Ex Taq 试剂盒的操作进行反转录和目的基因的实时荧光定量逆转录 PCR（Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction，RT-qPCR）分析，以 *ACT1* 为内参基因，引物见表 2。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *SEC1* 和 *SSO2* 的相对表达量。

**表 2 本研究所用引物**

Table 2 Primers used in this study

| 引物 | 引物序列(5′-3′) | 备注 |
|---|---|---|
| *SEC1pu*-F | CATTGTAAAACACGCGGAC | 从基因组上获取 *SEC1* 启动子及其上下游 400～500 bp 的序列 |
| *SEC1pd*-R | GCCTACAATCTTCCTCACG | |
| *SSO2pu*-F | CACAGGCAGATTCTTGTTGAGCAGC | 从基因组上获取 *SSO2* 启动子及其上下游 400～500 bp 的序列 |
| *SSO2pd*-R | CGTTGATGGCGGCTTCCACTTC | |
| *HIS*-F | GCGATACAGCTATTATTACAGGCACTCATTGTACTGAGAGTGCAC | 扩增带有同源臂的 *HIS* 片段 |
| *HIS*-R | CTGTGCGTCTTGAGTTGAAGTCAGGAATCTAAAATACTGTGCGGTATTTC | |
| *HPGK1p*-F | GAAAATACCGCACAGTATTTTAGATTCCTGACTTCAACTCAAGACGC | 扩增带有能与 *HIS* 相连的同源臂的 *PGK1p* 片段 |
| *HPGK1p*-R | CCTCTGTAAATTCAATTAAATCAGACATTGTTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAG | |
| *LEU*-F | CCAAGCGGGCAGCAAAGGGTTGTGGGAATACTCAGGTA | 扩增带有同源臂的 *LEU* 片段 |
| *LEU*-R | GCGTCTTGAGTTGAAGTCAGGAATCTAAAATATAAGGGTTATTGAATATGA | |
| *LPGK1p*-F | CATATTCAATAACCCTTATATTTTAGATTCCTGACTTCAACTCAAGACGCAC | 扩增带有能够和 *LEU* 相连的同源臂的 *PGK1p* 片段 |
| *LPGK1p*-R | CTCATAAAGGATTAGCGTGCTCATTGTTTTATATTTGTTG | |
| *Zeocin*-F | CGATACAGCTATTATTACAGGCACTCCCCACACACCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTC | 扩增带有同源臂的 *Zeocin* 片段 |
| *Zeocin*-R | CGTCTTGAGTTGAAGTCAGGAATCTAAAATAAGCTTGCAAATTAAAGCCTTCGAGC | |
| *SEC1*-qRT-F | CAAGGTTCGTTCCCGCTGT | *SEC1* 的 Real-time PCR 引物 |
| *SEC1*-qRT-R | CGTGGTCCAAGCTGCCT | |
| *SSO2*-qRT-F | CAAGTGAGTGAGGAACAGGAG | *SSO2* 的 Real-time PCR 引物 |
| *SSO2*- qRT-R | GCTTCCACTTCTTCGTCAG | |
| *ACT1*-qRT-F | GCCGAAAGAATGCAAAAGG | *ACT1* 的 Real-time PCR 引物 |
| *ACT1*-qRT-R | GGAAGGTAGTCAAAGAAGCCAGA | |
| M13-F | TGTAAAACGACGGCCAGT | pMD19-T 鉴定引物 |
| M13-R | CAGGAAACAGCTATGAC | |
| MAT-F-R | AGTCACATCAAGATCGTTTATGG | 配型鉴定引物 |
| MAT-α-R | GCACGGAATATGGGACTACTTCG | |
| MAT-a-R | ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG | |

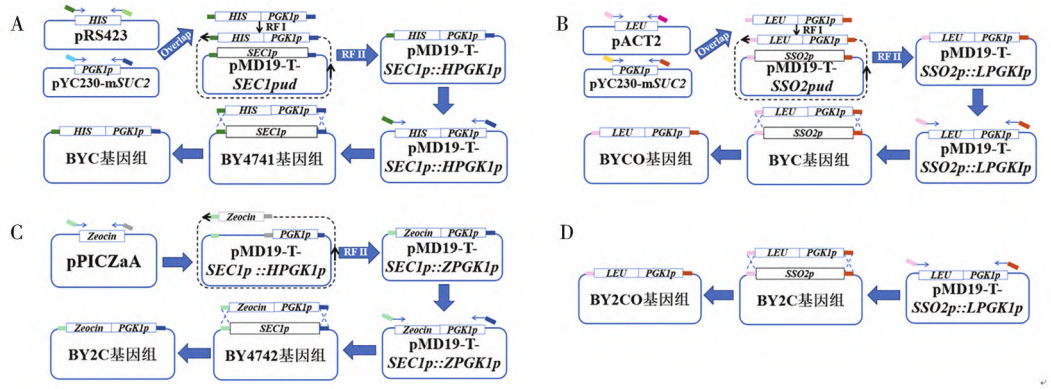



**图 2 重组菌株构建示意图**

Fig. 2 Schematic diagram of recombinant strain construction

A～D 分别为重组菌株 BYC、BYCO、BY2C 和 BY2CO 的构建流程示意图

A-D is schematic diagrams of the construction processes for the recombinant strains BYC, BYCO, BY2C, and BY2CO

1.2.3 重组菌株胞外蛋白分泌量的测定 以牛血清蛋白为对照标准品,采用 Bradford 法测定重组菌株的胞外蛋白分泌浓度[30-31]。取 100 μL 经 8 000 r/min 离心 5 min 的发酵液上清,添加至 500 μL 蛋白工作液中,通过检测其在 595 nm 下的吸光值,代入标准曲线计算浓度。

1.2.4 Suc2 的分泌效率测定 挑取单菌落至 10 mL YPD/G418 培养基,30 ℃、200 r/min 培养 16 h 获得种子液,转接至 10 mL 菊糖发酵培养基,初始 $OD_{600}$ =0.2,30 ℃、100 r/min 发酵 48 h。随后取样,按公式计算分泌效率:Suc2 分泌效率(%) =(发酵液上清蔗糖酶酶活力/发酵液蔗糖酶酶活力) ×100%[32]。取菌液和发酵液上清,采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-Dinitrosalicylic acid,DNS)法测定蔗糖酶活力[33]。以葡萄糖为标准品制作标准曲线。取 20 μL 稀释样品与 180 μL 2%(质量浓度)蔗糖混匀,50 ℃孵育 15 min,随后加入等体积 DNS 溶液,沸水浴 5 min,测定 $OD_{540}$。酶活力定义为每分钟催化产生 1 μmoL 葡萄糖所需的酶量为 1 U。

1.2.5 菌株的发酵性能分析 挑取单菌落至 10 mL YPD 培养基中培养获取种子液。将种子液接种至 10 mL 菊糖培养基中,30 ℃、100 r/min 条件下培养。每 12 h 取样 1 次,检测菌株的生物量、蔗糖酶活力、乙醇含量以及总糖残留量。最后,色谱分析发酵终止时的底物糖组成。① 生物量测定:取等体积菌液,经离心去除上清液后,称量菌体湿重。② 蔗糖酶活力测定参考 1.2.4。③ 乙醇产量测定:取 1 mL 过 0.22 μm 滤膜的发酵液,5 倍稀释后,加入 2.7 g NaCl 并搅拌以除去水分。然后,利用气相色谱分析发酵液中的乙醇含量。色谱柱使用安捷伦 VF-WAXms(30 m ×0.25 mm ×0.50 μm),采用顶空进样分析。氢离子火焰检测器温度设定为 240 ℃,氢气流量为 30 mL/min,空气流量为 300 mL/min,尾吹气流量为 20 mL/min。柱温从 45 ℃起始,以 10 ℃/min 的增速升温至 80 ℃保持 3 min,然后以 25 ℃/min 的增速升温至 200 ℃保持 5 min,最终洗脱样本。④ 残留总糖浓度检测:取等量发酵液上清,稀释 100 倍。将稀释上清液与等体积 4 mol/L $H_2SO_4$ 混匀,煮沸 30 min 后,加入适量 4 mol/L NaOH 中和。最后,采用 DNS 法测定残留总糖浓度,并计算菊糖转化率:菊糖转化率(%) =[乙醇产量/(总糖消耗量 ×0.511)] ×100%[34]。⑤ 发酵终点的离子色谱分析:使用配备 CarboPac PA20 柱的离子色谱法观察发酵终点菊糖的降解情况。取适量过 0.22 μm 滤膜的发酵液上清,稀释 100 倍,取 25 μL 样品上样。在 30 ℃柱温下,以 0.5 mL/min 的流速进行 60 min 梯度洗脱。具体操作:0 ~5 min 用 20 mmol/L NaOH 平衡;5 ~10 min 用 20 ~100 mmol/L NaOH 洗脱;10 ~60 min 维持 100 mmol/L NaOH 并以 0 ~0.5 mol/L NaAc 进行梯度洗脱。

1.2.6 数据分析 所有的实验均设置 3 个生物学重复,使用 $t$ 检验分析和单因素方差分析评估数据的显著性,显著性差异定义为 $P<0.05$。

## 2 结果与分析

### 2.1 高效分泌表达 Suc2 酿酒酵母重组菌株的构建

为解析囊泡运输关键基因 *SEC1* 与 *SSO2* 对 Suc2 分泌的调控效应,首先以酿酒酵母 BY4741 和 BY4742 为出发菌株,通过同源重组将 *SEC1* 和 *SSO2* 的天然启动子替换为组成型强启动子 *PGK1p*,构建双基因过表达菌株 BYCO 与 BY2CO(图 2)。进一步通过二倍体配合获得囊泡运输途径强化的二倍体菌株 BY3CO。将携带 MFα 信号肽的 Suc2 表达载体 pYC230-*mSUC2* 分别转化至 BY 系列菌株,获得重组菌株 BYmS、BY2mS、BY3mS、BYCOmS、BY2COmS 及 BY3COmS(表 1)。

采用 RT-qPCR 技术测定重组菌株中 *SEC1* 和 *SSO2* 基因的 mRNA 转录水平,验证分泌途径改造重组菌株的目的基因过表达效果。结果如图 3 所示,*SEC1* 在重组菌株 BYCOmS、BY2COmS 与 BY3COmS 中的相对表达量较对照组原始菌株 BYmS、BY2mS 与 BY3mS 分别显著提升 3.15、3.59、2.59 倍,*SSO2* 表达量提升 8.80、9.00、9.69 倍,证实启动子替换可有效实现靶基因过表达。其中,在 BY3COmS 中 *SEC1* 与 *SSO2* 的相对表达量高于 BYCOmS 和 BY2COmS。这一结果表明相较于单倍体菌株,二倍体菌株可能拥有更强的囊泡转运能力。

### 2.2 重组菌株囊泡转运能力的分析

为探究进一步验证 *SEC1* 和 *SSO2* 过表达对酿酒酵母囊泡运输能力的影响,本研究通过测定

重组菌株发酵液上清蛋白含量评估其分泌性能。结果如图 4 所示，过表达 *SEC1* 与 *SSO2* 的重组菌株 BYCOmS、BY2COmS 和 BY3COmS 胞外蛋白分泌量较未改造菌株有显著提升，BY3COmS 较原始菌株 BYmS 提升了 216.67%。此外，二倍体菌株（BY3COmS 和 BY3mS）的胞外蛋白分泌量较其对应单倍体菌株（BYCOmS/BY2COmS 和 BYmS/BY2mS）均显著提高，与转录水平结果一致。该结果表明染色体倍性增加可协同增强囊泡运输系统的通量。

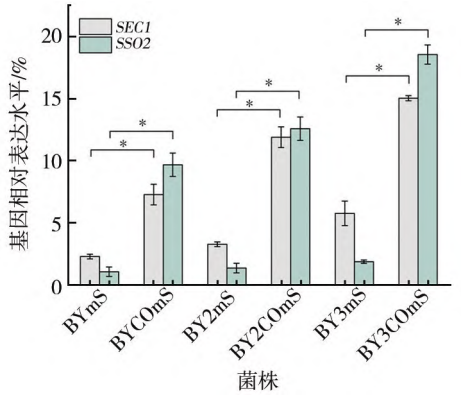



**图 3　重组菌株的 *SEC1* 和 *SSO2* 的相对表达水平**

Fig. 3　Relative expression levels of *SEC1* and *SSO2* in recombinant strains

* 表示组间差异显著（$P<0.05$），图 6 同

* indicates significant difference between groups ($P<0.05$), same as figure 6

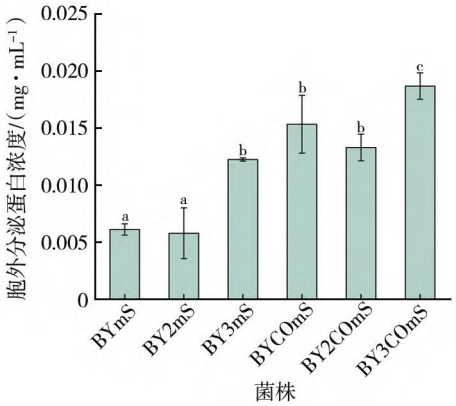



**图 4　重组菌株的蛋白质分泌量**

Fig. 4　Protein secretion of recombinant strains

不同小写字母表示组间差异显著（$P<0.05$），图 5 同

Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$), same as figure 5

## 2.3　重组菌株 Suc2 分泌能力的测定

基于重组菌株在蛋白分泌能力方面的表现，进一步评估囊泡运输通路强化对重组菌株 Suc2 蛋白分泌效率的影响。结果如图 5 所示，发酵 48 h 后，各菌株的 Suc2 蛋白分泌效率为 12.13% ~ 24.52%。与未进行 *SEC1* 和 *SSO2* 过表达的对照组 BYmS、BY2mS 和 BY3mS 相比，BYCOmS、BY2COmS 和 BY3COmS 菌株的 Suc2 分泌效率显著提升，分别是对照组的 1.39、1.39、1.56 倍。单倍体菌株 BYCOmS 与 BY2COmS 以及 BYmS 与 BY2mS 的分泌效率存在显著差异，这可能与 BY4742 和 BY4741 的遗传和代谢背景差异有关[35]。与初始菌株 BYmS 的 Suc2 分泌效率（12.13%）相比，BY3COmS 的 Suc2 分泌效率显著提升至 22.61%，增幅达 86.46%。然而，此处并没有观察到二倍体菌株（BY3mS 和 BY3COmS）较单倍体菌株（BY2mS 和 BY2COmS）的显著差异，甚至略低于单倍体菌株。该现象可能是由于囊泡运输通量的整体增加，引发 Suc2 与其他分泌蛋白对转运载体的竞争性抑制，从而降低了 Suc2 的特异性分泌效率。

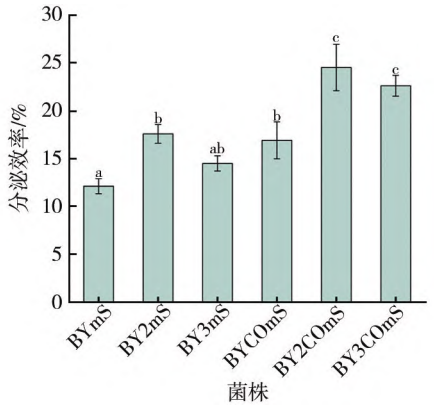



**图 5　重组菌株在菊糖培养基中发酵 48 h 的 Suc2 分泌效率**

Fig. 5　Suc2 secretion efficiency of recombinant strains after 48 h of fermentation in inulin-based medium

## 2.4　高效分泌表达 Suc2 重组菌株的发酵性能分析

为评估重组菌利用菊糖生产乙醇的能力，将 BYmS、BY2mS、BY3mS、BYCOmS、BY2COmS 和 BY3COmS 接种至菊糖培养基，每 12 h 取样 1 次，测定发酵液的菌体生物量、蔗糖酶活力、残留总糖浓度和乙醇产量（图 6）。

菌株的菌体生物量、蔗糖酶活力、乙醇产量随发酵时间延长而增加，均在 84 h 达到峰值。过表

达囊泡运输过程基因的重组菌株生长能力(图 6A)、蔗糖酶活力(图 6B)、乙醇产量(图 6C)均优于未进行改造的菌株,说明菌株囊泡转运能力的提升使得 Suc2 分泌含量增加,提高了菌株利用菊糖的能力,促进菌株更好地生长。该现象与 Xu 等[36]研究结果一致。值得注意的是,虽然 BY2COmS 与 BY3COmS 的最高酶活力相当,但 BY3COmS 的乙醇产量和最终菊糖转化率均为最高,这是由其生物量和酶活力共同作用的结果。二倍体重组菌株 BY3COmS 在 84 h 时生物量达 35.00 g/L,蔗糖酶活力 318.80 U/mL,较 BYmS 分别提高 33.49% 和 79.48%。BY3COmS 于 84 h 的乙醇产量达 100.38 g/L,高于所有重组菌株,较原始菌株 BYmS 提升了 12.61%。发酵残留总糖含量结果显示,菌株的残留总糖在0 ~ 24 h快速消耗后趋于稳定(图 6D),说明发酵终点时大部分菊糖已转化为菌体和乙醇。重组菌株(BYCOmS、BY2COmS、BY3COmS)的总糖消耗量与对照菌株(BYmS、BY2mS、BY3mS)差异并不显著。图 6E 结果显示,重组菌株的菊糖转化率显著高于对照菌株,其中二倍体菌株 BY3COmS 的转化率最高,较 BYmS 提升了 10.32%,达到 94.77%。

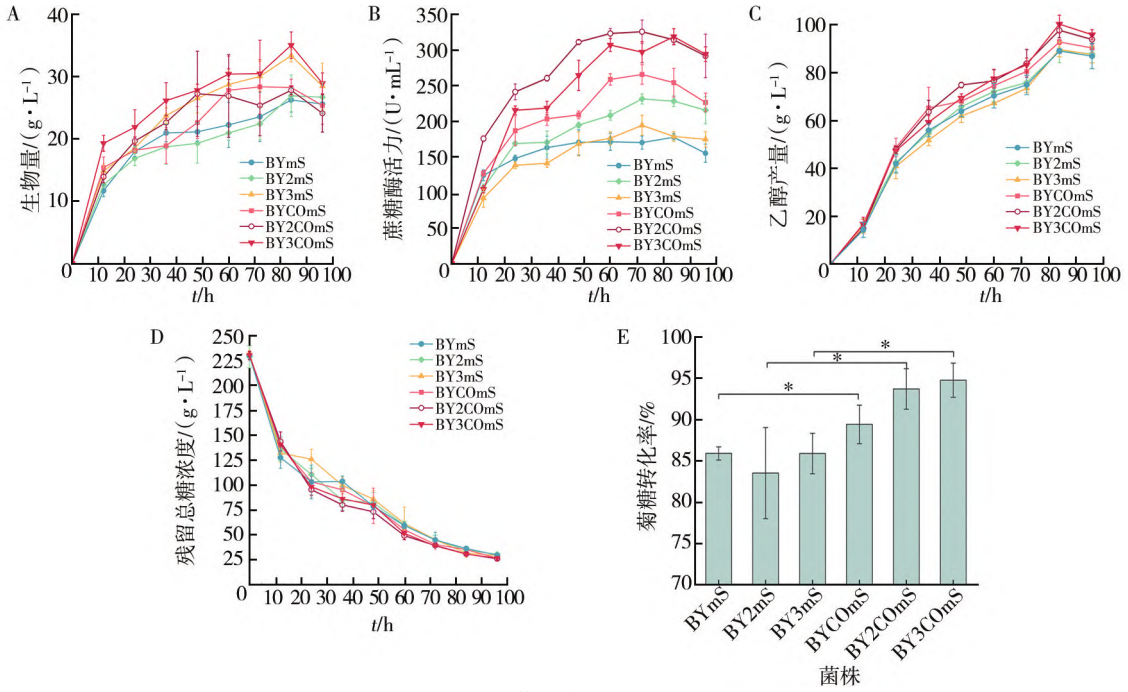



**图 6　重组菌株的发酵性能分析**

Fig. 6　Fermentation performance analysis of recombinant strains

离子色谱结果显示(图 7),发酵终点菊糖培养基中绝大部分糖被菌株用于自身生长和乙醇生产。过表达 *SEC1* 和 *SSO2* 的重组菌株均能高效降解不同聚合度的菊糖,其中聚合度小于等于 24(保留时间 0 ~ 34 min)的组分被完全降解,聚合度大于 24 的组分也被显著分解。二倍体菌株 BY3COmS 对菊糖的降解能力优于其他重组菌株,该结果与图 6 一致。上述结果表明,通过强化囊泡运输通路(*SEC1* 和 *SSO2* 过表达)及倍性工程构建的二倍体菌株 BY3COmS,展现出优异的菊糖水解与生物乙醇合成性能,具备工业化生产菌株的应用潜力。

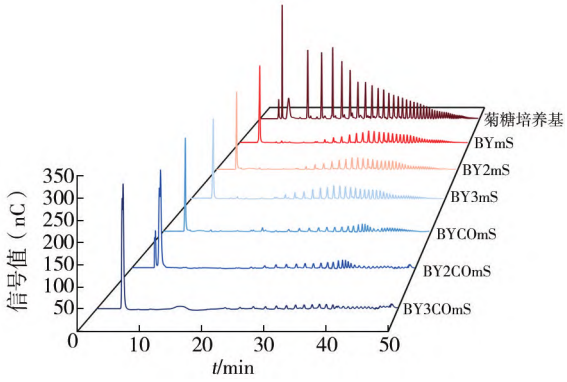



**图 7　重组菌株发酵终点残糖组分离子色谱图**

Fig. 7　Ion chromatogram of residual sugars in recombinant strains' fermentation broth at the end of fermentation

## 3 讨 论

转录水平分析显示,在囊泡运输通路强化的重组菌株中,*SEC1* 与 *SSO2* 的表达量较对照组显著提升,说明强启动子 *PGK1p* 替换策略可有效突破内源基因表达限制,为靶向分泌途径的基因剂量调控提供了直接证据。进一步的胞外蛋白分泌定量结果证实,过表达 *SEC1* 与 *SSO2* 基因可强化高尔基体-质膜囊泡运输通路,以显著提升酿酒酵母蛋白分泌能力(216.67%)。此外,本研究中二倍体菌株(BY3COmS 和 BY3mS)显示出更强的蛋白分泌能力(图 4),这可能是由于其遗传稳定性更强、细胞和细胞器尺寸更大,使其能够处理更大的分泌负荷[37],从而更好地满足高水平蛋白质分泌的代谢需求[38]。

尽管 *SSO2* 和 *SEC1* 过表达与菌株的倍性增加显著提升了菌株的总蛋白分泌量,但 BY3COmS 中 Suc2 分泌效率反而略低于 BY2COmS,这一现象可能归因于囊泡分选竞争效应。囊泡运输通量的增加可能降低了分选保真度,当分泌蛋白负荷过高时,蛋白间对有限的 COPII 囊泡空间竞争会导致竞争性抑制,尽管总通量增加,但某些蛋白质的运输效率会降低[39]。这种竞争效应在囊泡运输通量改造后的二倍体重组菌株 BY3COmS 中可能更为显著。

重组菌株的发酵性能分析结果显示,强化囊泡运输通路能够提升菌株在菊糖培养基中的生长能力、蔗糖酶活力、乙醇产量、菊糖转化率。值得注意的是,发酵至 84 h 时,虽然 BY2COmS 与 BY3COmS 的酶活力水平相当,但二倍体改造菌株 BY2COmS 的乙醇产量和菊糖转化率更高。上述现象可能与二倍体菌株的高生物量积累特性密切相关。研究表明,多倍体菌株在工业生产过程中展现出更高的生物量和更强的鲁棒性,在发酵压力下能够更好地适应环境变化[40],为高生物量驱动的乙醇高效合成提供了理论依据。与菊糖乙醇高产菌 *S. cerevisiae* JZ1C(乙醇得率为 79.7%)[41] 相比,BY3COmS 的菊糖转化率达到 94.77%,表明酿酒酵母的理性改造是一种有效提高其菊糖乙醇生产能力的策略。

综上所述,本研究通过酿酒酵母分泌途径强化策略和倍性工程的整合,构建了 *SEC1* 和 *SSO2* 基因过表达的单倍体与二倍体重组菌,成功提高了 Suc2 的分泌水平并增强了菌株在菊糖发酵中的乙醇生产性能,最终构建出高效水解菊糖的二倍体重组菌株 BY3COmS。本研究为构建高效菊糖乙醇生产菌株提供了依据,也为开发高鲁棒性的工业菌株提供了参考。

**参考文献:**


[1] Almeida MAD, Colombo R. Production chain of first-generation sugarcane bioethanol: Characterization and value-added application of wastes[J]. BioEnergy Research, 2023, 16(2): 924-939.

[2] Singh R, Singh T, Hassan M, et al. Biofuels from inulin-rich feedstocks: A comprehensive review[J]. Bioresource Technology, 2022, 346: 126606.

[3] Tsigoriyna L, Stefanov S, Armenova N, et al. Microbial conversion of inulin to valuable products: The biorefinery concept [J]. Fermentation, 2024, 10(12): 640.

[4] Khamwachirapithak P, Sae-Tang K, Mhuantong W, et al. Optimizing ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* at ambient and elevated temperatures through machine learning-guided combinatorial promoter modifications[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(10): 2897-2908.

[5] Tsegaye KN, Alemnew M, Berhane N. *Saccharomyces cerevisiae* for lignocellulosic ethanol production: A look at key attributes and genome shuffling[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2024, 12: 1466644.

[6] Zhang H, Zhang P, Wu T, et al. Bioethanol production based on *Saccharomyces cerevisiae*: Opportunities and challenges[J]. Fermentation, 2023, 9(8): 709.

[7] Yang F, Zhang X, Lu Y, et al. Inulin catabolism in *Saccharomyces cerevisiae* is affected by some key glycosylation sequons of invertase Suc2[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(3): 471-479.

[8] Yang F, Liu ZC, Wang X, et al. Invertase Suc2-mediated inulin catabolism is regulated at the transcript level in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 59.

[9] Valk SCD, Bouwmeester SE, Hulster ED, et al. Engineering proton-coupled hexose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2022, 15(1): 47.

[10] Wang B, Zhao X, Fu T, et al. Glucose starvation stimulates the promoting strength of a novel evolved Suc2 promoter[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(37): 13838-13847.

[11] Rodrigues CIS, Ridder MD, Pabst M, et al. Comparative proteome analysis of different *Saccharomyces cerevisiae* strains during growth on sucrose and glucose[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 2126.

[12] Xue S, Liu X, Pan Y, et al. Comprehensive analysis of signal peptides in *Saccharomyces cerevisiae* reveals features for efficient secretion[J]. Advanced Science, 2023, 10(2): 2203433.

[13] Li L, Lin J, Wu N, et al. Review and outlook on the international renewable energy development[J]. Energy and Built Environment, 2022, 3(2): 139-157.
[14] 郑聪聪,周海龙,赵晶晶,等. 蔗糖转化酶 SUC2 分泌表达系统的改造[J]. 大连工业大学学报,2021,40:1-5.
[15] Hou J, Österlund T, Liu Z, et al. Heat shock response improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 3559-3568.
[16] Cleaver A, Luo R, Smith OB, et al. High-throughput optimisation of protein secretion in yeast via an engineered biosensor[J]. Trends in Biotechnology, 2024, 43(4): 838-867.
[17] O′Riordan NM, Juricć V, O′Neill SK, et al. A yeast modular cloning (MoClo) toolkit expansion for optimization of heterologous protein secretion and surface display in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13(4): 1246-1258.
[18] Zhao M, Ma J, Zhang L, et al. Engineering strategies for enhanced heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): 32.
[19] Yang S, Song L, Wang J, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of recombinant proteins[J]. Engineering Microbiology, 2024, 4(1): 100122.
[20] Tang H, Song M, He Y, et al. Engineering vesicle trafficking improves the extracellular activity and surface display efficiency of cellulases in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 53.
[21] Valkonen M, Penttilä M, Saloheimo M. Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded-protein response pathway on protein production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4): 2065-2072.
[22] Gasser B, Sauer M, Maurer M, et al. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20): 6499-6507.
[23] Postaru M, Tucaliuc A, Cascaval D, et al. Cellular stress impact on yeast activity in biotechnological processes: A short overview[J]. Microorganisms, 2023, 11(10): 2522.
[24] Qin L, Dong S, Yu J, et al. Stress-driven dynamic regulation of multiple tolerance genes improves robustness and productive capacity of *Saccharomyces cerevisiae* in industrial lignocellulose fermentation[J]. Metabolic Engineering, 2020, 61: 160-170.
[25] Jiang J, Yin R, Xie Y, et al. Effects of cofermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and different lactic acid bacteria on the organic acid content, soluble sugar content, biogenic amines, phenol content, antioxidant activity and aroma of prune wine[J]. Food Chemistry: X, 2024, 22: 101502.
[26] Chen Y, Yang Y, Cai W, et al. Research progress of anti-environmental factor stress mechanism and anti-stress tolerance way of *Saccharomyces cerevisiae* during the brewing process[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(33): 12308-12323.
[27] Fukuda N, Honda S, Fujiwara M, et al. Polyploid engineering by increasing mutant gene dosage in yeasts[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(3): 979-992.
[28] Dilorio AA, Weathers PJ, Campbele DA. Comparative enzyme and ethanol production in an isogenic yeast ploidy series[J]. Current Genetics, 1987, 12(1): 9-14.
[29] Liu L, Jin M, Huang M, et al. Engineered polyploid yeast strains enable efficient xylose utilization and ethanol production in corn hydrolysates[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 655272.
[30] Pang C, Liu S, Zhang G, et al. Enhancing extracellular production of lipoxygenase in *Escherichia coli* by signal peptides and autolysis system[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 42.
[31] Yu S, Zhang G, Liu Q, et al. Construction and testing of *Yarrowia lipolytica* recombinant protein expression chassis cells based on the high-throughput screening and secretome[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 185.
[32] 王天琦,王碧莹,付彤,等. 不同信号肽对酿酒酵母蔗糖转化酶 Suc2 分泌表达水平的影响[J]. 微生物学杂志,2023,43(5):9-20.
[33] Charoenwongpaiboon T, Charoenwongphaibun C, Wangpaiboon K, et al. Endo-and exo-levanases from *Bacillus subtilis* HM7: Catalytic components, synergistic cooperation, and application in fructooligosaccharide synthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 271(1): 132508.
[34] Zhao ZP, Wang XL, Zhou GY, et al. Hydrolysis kinetics of inulin by imidazole-based acidic ionic liquid in aqueous media and bioethanol fermentation[J]. Chemical Engineering Science, 2016, 151: 16-24.
[35] Schiabor KM, Quan AS, Eisen MB. *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria are required for optimal attractiveness to *Drosophila melanogaster*[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e113899.
[36] Xu L, Shen Y, Hou J, et al. Secretory pathway engineering enhances secretion of cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 117(1): 45-52.
[37] Zörgö E, Chwialkowska K, Gjuvsland AB, et al. Ancient evolutionary trade-offs between yeast ploidy states[J]. PLoS Genetics, 2013, 9(3): e1003388.
[38] Huang M, Bao J, Hallströ m BM, et al. Efficient protein production by yeast requires global tuning of metabolism[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 1131.
[39] Carrillo AM, Gómez-Navarro N, Li XH, et al. Cargo crowding contributes to sorting stringency in COPII vesicles[J]. The Journal of Cell Biology, 2020, 219(7): e201806038.
[40] Mozzachiodi S, Krogerus K, Gibson B, et al. Unlocking the functional potential of polyploid yeasts[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 2580.
[41] Hu N, Yuan B, Sun J, et al. Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from *Jerusalem artichoke* by consolidated bioprocessing[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(5): 1359-1368.